

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

E3U

ES00/354

09/856035

REC'D 27 NOV 2000	
WIPO	PCT

OFICINA ESPAÑOLA

de

PATENTES y MARCAS

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9902364, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 23 de Septiembre de 1999.

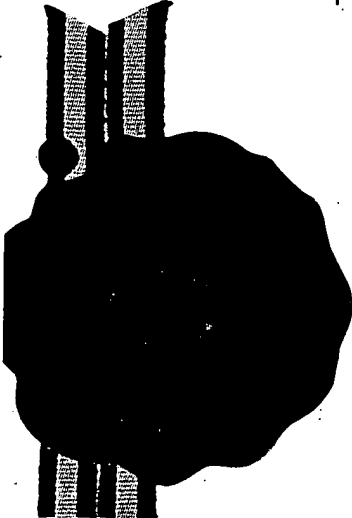
Madrid, 10 de noviembre de 2000

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.



M. MADRUGA





OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

NUMERO DE SOLICITUD 4210 4

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.

Data 23 SET. 1999

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

4210, 13:55

(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(1)	(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN
<input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION	MODALIDAD
<input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL	NUMERO SOLICITUD
<input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD	FECHA SOLICITUD
<input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	MODALIDAD
	NUMERO SOLICITUD
	FECHA SOLICITUD

(4) SOLICITANTE(S) APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA NOMBRE DNI

ASAC COMPAÑIA DE BIOTECNOLOGIA E
INVESTIGACION, S.A.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. SECRETARIA GENERAL

A-53027942

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO SAGITARIO, 14
LOCALIDAD ALICANTE
PROVINCIA ALICANTE
PAIS RESIDENCIA ESPAÑA
NACIONALIDAD ESPAÑA
TELEFONO
CODIGO POSTAL 03006
CODIGO PAIS ES
CODIGO NACION ES

(6) INVENTOR(ES) (7) ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR
☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR (8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO
☒ INVENC. LABORAL ☐ CONTRATO ☐ SUCESION

APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
QUINTANILLA ALMAGRO	Eliseo	ESPAÑOLA	ES
RAMIREZ BOSCA	Ana	ESPAÑOLA	ES

(9) TITULO DE LA INVENCION
NUEVAS ACTIVIDADES FARMACOLOGICAS DE LOS EXTRACTOS DE CURCUMA LONGA

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P. ☐ SI ☒ NO

(11) EXPOSICIONES OFICIALES

LUGAR FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAIS DE ORIGEN	COD PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P. ☐ SI ☒ NO

(14) REPRESENTANTE APELLIDOS NOMBRE

DOMICILIO Domicilio, 20, 6º, OFI. 606 LOCALIDAD ALICANTE

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

☒ DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS. 25
☒ REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS. 2
☒ DIBUJOS. N.º DE PAGINAS. 7
☒ RESUMEN
☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD
☐ TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD
☒ DOCUMENTO DE REPRESENTACION
☐ PRUEBAS
☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS
☒ HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS
☐ OTROS

FIRMA DEL FUNCIONARIO

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NUMERO DE SOLICITUD
990236

FECHA DE PRESENTACION

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

- ☒ PATENTE DE INVENCION
☐ MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES	APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRES	DNI

(6) INVENTORES	APELLIDOS	NOMBRE	NAC.
BERND PARDO ZAPATA DIAZ ALPERI PAMIES MIRA CARRION GUTIERREZ SEMPERE ORTELLS		August José Joaquín David Miguel Angel José Miguél	DE ES ES ES ES ES

(11) EXPOSICIONES OFICIALES	
LUGAR:	FECHA:

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	CODIGO	NUMERO	FECHA



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD
P-902364

FECHA DE PRESENTACION

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

NUEVAS ACTIVIDADES FARMACOLOGICAS DE LOS EXTRACTOS DE CURCUMA LONGA COMO AGENTE ANTIPROLIFERATIVO Y FOTOSENSIBILIZANTE, Y SU USO EN LAS PATOLOGIAS PROLIFERATIVAS COMO LA PSORIASIS, ASI COMO REDUCTORA DEL FIBRINOGENO PLASMATICO Y DEL COCIENTE APOLIPOPROTEINA B/APOLIPOPROTEINA A-I, SIN ALTERAR LOS DEMAS PARAMETROS DE LA COAGULACION.

GRAFICO



P 9902364

(71) SOLICITANTE(S)

ASAC COMPAÑIA DE BIOTECNOLOGIA E INVESTIGACION, S.A.

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

DOMICILIO

SAGITARIO, 14, ALICANTE, 03006, ESPAÑA

(72) INVENTOR(ES)

QUINTANILLA ALMAGRO, Eliseo, y OTROS

(73) TITULAR(ES)

ASAC COMPAÑIA DE BIOTECNOLOGIA E INVESTIGACION, S.A.

(11) N.º DE PUBLICACION

(45) FECHA DE PUBLICACION

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TITULO

NUEVAS ACTIVIDADES FARMACOLOGICAS DE LOS EXTRACTOS
DE CURCUMA LONGA

(57) RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

NUEVAS ACTIVIDADES FARMACOLOGICAS DE LOS EXTRACTOS DE CURCUMA LONGA COMO AGENTE ANTIPROLIFERATIVO Y FOTOSENSIBILIZANTE, Y SU USO EN LAS PATOLOGIAS PROLIFERATIVAS COMO LA PSORIASIS, ASI COMO REDUCTORA DEL FIBRINOGENO PLASMATICO Y DEL COCIENTE APOLIPOPROTEINA B/APOLIPOPROTEINA A-I, SIN ALTERAR LOS DEMAS PARAMETROS DE LA COAGULACION.

5 **NUEVAS ACTIVIDADES FARMACOLOGICAS DE LOS EXTRACTOS DE *CURCUMA LONGA***

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención la describe la actividad de un extracto acuoso y un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* como agente antiproliferativo con una actividad similar a la betametasona -17- valerato y una actividad fotosensibilizante superior a los psoralenos y su uso en una composición farmacéutica como agente en patologías proliferativas como psoriasis, micosis, fungoide, dermatitis atópica, fotodermatosis sin tener los efectos secundarios de los psoralenos , corticoides y/o retinoides.

- La presente invención desarrolla una nueva actividad farmacológica de los extractos de Curcuma reductor del fibrinógeno plasmático y reduciendo el cociente apolipoproteína B/apolipoproteína A-I, sin alterar los demás parámetros de la coagulación.
- 20

ESTADO DE LA TECNICA

- 25 La psoriasis es una dermatitis crónica inflamatoria de etiología desconocida. Clínicamente se caracteriza por unas lesiones papulosas, sobre máculas eritemato-escamosas. La mayoría de estas lesiones se desencadenan por alteraciones de la proliferación celular, estas vienen marcadas por mecanismos inmunológicos y genéticos.

30

Encontramos un incremento del ácido araquínónico y sus derivados, tanto en piel normal como en piel patológica; un incremento de poliaminas, un aumento

- 5 de leucotrieno B4 en la escama. A partir de la epidermis y dermis encontramos un aumento de células de Langerhans con una disminución del infiltrado de linfocitos CD8 frente a CD4. Los neutrófilos de éstos pacientes sintetizan el doble leucotrienos B4 que los individuos sanos.

- 10 La interleucina IL-6 es una citocina estructuradora del factor-2(BSF-2) estructuralmente idéntica al interferón β -2 (IFN- β -2). La IL-6 se sintetiza en los fibroblastos, monocitos y células T. Esta citocina estimula la fase aguda la síntesis de proteínas y la producción de inmunoglobulinas.
- 15 La IL-8 es una interleucina directamente implicada en la psoriasis ya que es la responsable de producir la migración de los neutrófilos que se producen en la epidermis y consecuentemente amplifica el proceso inflamatorio.

- En la terapia actual que se utiliza en la psoriasis es fundamental actuar sobre la proliferación celular y sobre la producción de citocinas mediante el uso de glucocorticoides y/o agentes fotosensibilizantes (psoralenos).
- 20

- Los cultivos celulares son modelos reconocidos para el estudio de la fisiología celular y el efecto de las drogas. Las células HaCat derivan de queratinocitos humanos que exhiben las mismas diferenciaciones que los queratinocitos normales en cultivo, por consiguiente las células HaCat son un modelo
- 25 extraordinario para poder testar distintas sustancias de aplicación tópica.

- Los queratinocitos son células biológicamente muy activas cuya función no es solamente la producción de síntesis de queratinas para formar el estrato córneo
- 30 sino también tienen capacidad inmunológica basada en la producción y secreción de citoquinas y la expresión selectiva de receptores en su superficie.

- Diversos estímulos incluidas las radiaciones ultravioletas inducen respuestas inflamatorias que actúan directamente sobre estos queratinocitos produciendo una liberación de citoquinas y de moléculas de adhesión. Esta producción de
- 35 sustancias a nivel de la epidermis inician los cuadros de inflamación cutánea,

- 5 liberándose la IL-6 y la IL-8 que son dos citocinas implicadas en los procesos inflamatorios cutáneos.

Los glucocorticoides representan a unas sustancias más utilizadas dentro del campo de la Dermatología debido a sus propiedades inmunosupresoras y:

- 10 antiinflamatorias, efecto que se pone de manifiesto tras la irradiación con UV.

- Diversos estudios demuestran que los corticoides tienen efecto sobre la producción de citoquinas proinflamatorias. Así glucocorticoides conocidos tales como hidrocortisona-17- butirato, betametasona-17-valerato producen una
- 15 disminución de las citoquinas inflamatorias tras la irradiación de luz ultravioleta.

- La accesibilidad de la piel permite a menudo el tratamiento de sus alteraciones: mediante la aplicación tópica de medicamentos. Los corticoides tópicos, gracias a su actividad antiinflamatoria, vaso constrictora y antimicótica ha mostrado ser
- 20 útiles en una gran variedad de dermatosis. Sin embargo la aplicación de los corticoides presenta una serie de efectos secundarios directamente sobre la piel:

- Atrofias cutáneas, lo cual se traduce en una piel fina, transparente, lesiones purpúricas, cicatrices pseudoestelares y estrías por catabolismo de tipo elástico.
- 25 - Retraso en la cicatrización de las heridas por inhibición de la función de los fibroblastos.
- Enmascaramiento y destipificación de las infecciones cutáneas especialmente de dermatofitosis, llegando a dificultar el diagnóstico y pudiendo aparecer infecciones cutáneas víricas o bacterianas.
- 30 - Trastornos de la pigmentación de la piel con hiper o hipopigmentación.
- Dermatitis de contacto.
- Fenómenos de habituación y taquifiloxia que obliga a usar derivados cada vez más potentes y el rebote con empeoramiento y aparición de
- 35 formas más severas del proceso (psoriasis pustulosa) que la supresión brusca de su administración puede provocar.

- 5 Los efectos adversos sistémicos son afortunadamente menos frecuentes ya que se requiere el uso de corticoides durante un tiempo prolongado, como es el caso de la psoriasis. Los efectos secundarios más observados son:

- Inhibición del eje hipotálamo – hipofisario – suprarrenal.
- La provocación de episodios de hiperglucemia y glucemia.

- 10 - Descenso del número de eosinófilos.
- La presentación de manifestaciones clínicas del Síndrome de Cushing.

- Otras terapias utilizadas en la psoriasis son el uso por vía oral o tópica de sustancias fotosensibilizantes (psoralenos) acompañadas de radiaciones ultravioletas A. La fotoquímica de los psoralenos no es bien conocida pudiendo actuar a varios niveles. Los psoralenos se unen al DNA y RNA, pero interaccionan con los lisosomas, endotelios, membranas citoplasmáticas y células dérmicas. En la oscuridad el psoraleno se intercala entre las bases del DNA. Con la UVA se producen monoadductos de ciclobutano al unirse con una base de timina o citosina del DNA. Si continúa la radiación, un nuevo fotón estimula al otro doble enlace del psoraleno para formar un enlace cruzado con la timina de la otra cadena de DNA. La formación de estos aductos bifuncionales suprime la síntesis de DNA. Otra reacción observada es que el psoraleno fotoactivado puede actuar con el oxígeno molecular dando un singlete de oxígeno, anión superóxido y radicales libres actuando estas formas reactivas sobre los queratinocitos. Así el uso de psoralenos presenta efectos secundarios bien conocidos en la literatura dermatológica tales como disminución de la inmunidad retardada, reacciones fototóxicas, inmunosupresión, disminución de la producción de la IL-1 por los queratinocitos y mayor propensión a los cánceres cutáneos.

- Por otra parte el uso de sustancias fotosensibilizantes se pueden utilizar en el tratamiento de diferentes patologías con un exceso de hiperproliferación tales como vitílico, dermatitis atópica, granuloma anular, liquen, micosis fungoide, linfomas, leucemia, etc.

- 5 Uno de los mayores factores de riesgo coronario es la concentración plasmática de fibrinógeno. Stone y Thorp *J. Royal College Gen Practitioners* **35**, 565-569 (1985), demostraron que en hombres entre 40-60 años existía una correlación entre los ataques cardíacos y los niveles plasmáticos de fibrinógeno. Especialmente, en hombres con elevado colesterol y alta presión arterial la
-
- 10 frecuencia de ataques cardíacos fueron 6 veces y 12 veces mayores, respectivamente, en individuos con altos niveles de fibrinógeno que los individuos con bajos niveles de fibrinógeno. Así en los modelos multivariantes la concentración de fibrinógeno es al menos tan importante como otros factores de riesgo en las patologías cardíacas tales como colesterol, tabaquismo, presión
- 15 arterial. Otra demostración del papel patogenético del fibrinógeno y sus productos ha sido descrito por Kaplan y Bini. *Arteriosclerosis* **9**, 109 (1989). Ellos concluyen con la implicación del fibrinógeno en las placas de ateroma. Así, el estudio de placas de ateroma por fluorescencia de anticuerpos (con anticuerpos policlonales antifibrinógeno) muestra el fibrinógeno o fibrina en un amplio rango
- 20 de lesiones ateroscleróticas.
- De la misma manera, Sadoshima y Tanaka. *Atherosclerosis* **34**, 93-97 (1979) han demostrado una acumulación de fibrinógeno y LDL en las arterias cerebrales humanas. En las placas tempranas de ateroma se observa
- 25 fibrinógeno en los intersticios de la íntima y entre las placas internas elásticas de lámina duplicadas. Los autores describen que la acumulación de fibrinógeno en la íntima precede a la LDL y por lo tanto es un mayor factor de riesgo el fibrinógeno que las LDL.
- 30 Por lo tanto, un fármaco capaz de reducir la concentración plasmática de fibrinógeno será útil en el tratamiento y/o profilaxis de las patologías cardiovasculares.
- Los fármacos utilizados como reductores del fibrinógeno (ácido salicílico, derivados cumarínicos) actúan aumentando la actividad fibrinolítica teniendo
- 35 efectos secundarios sobre los parámetros de la coagulación (índice de Quick, tiempo de trombina, tiempo de protombina, ATPP).

- 5 La apolipoproteína B es el componente proteico fundamental de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), de manera que elevadas concentraciones de esta proteína son indicadoras de una cantidad elevada de LDL. Esta lipoproteína es conocido que cuando se oxida, es captada por los macrófagos y su transformación en células espumosas resulta determinante en el inicio de las...
-
- 10 placas de ateroma. Así cuando mayor apolipoproteína B hay en el plasma el... riesgo aterogénico aumenta.

- La apolipoproteína A-I es un componente fundamental de la partícula de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Su función es activar la enzima lecitín-colesterol-acil-transferasa, encargada de la formación de ésteres de colesterol, a...
- 15 partir del colesterol libre procedente de los tejidos periféricos y de los fosfolípidos que forman la propia partícula de las HDL. Estas lipoproteínas resultan fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol ya que retiran el colesterol acumulado en los tejidos periféricos y lo llevan al hígado...
- 20 donde es eliminado en forma de ácidos biliares o recirculando a otras lipoproteínas. Así elevadas concentraciones de Apo A-I son indicativas de un menor riesgo aterogénico.

- Por lo tanto la relación Apo B/Apo A-I es mejor indicador del riesgo aterogénico, ya que la direccionalidad de los cambios en los procesos de aterosclerosis usualmente conlleva aumento de Apo B y una disminución de Apo A-I.
- 25

- La curcumina y los curcuminoides presentes en los rizomas de la *Curcuma longa* y en general en la familia de las Zingiberaceas han sido utilizados para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, a título de ejemplo se puede citar US 5891924 (inhibidor de la activación del NF kappa B), US 5336496 (inhibidor de la delta 5 desaturasa), EP 256353 (tratamiento de los síndromes de mala absorción), EP 568001 (agente antiviral), US 5108750 (reductor de la hiperlipidemia y agregación plaquetaria), FR 2655054 (protector celular) y EP 550807 (actividad antioxidante y antiinflamatoria), EP440885 (antiinflamatorio), EP 319058 (contra la caída del pelo), US 510750, US 4906471 y US 4842859
- 30
- 35

- 5 (agente antiagregante plaquetario y anticolesterol), WO 88/05304 (tratamiento de los desórdenes neurológicos), WO 96/03999 (reductor de los peróxidos lipídicos), ES 20103689 (modulador de las lipoproteínas de alta y baja densidad oxidadas, protector de los queratinocitos frente a los radicales libres y ~~aumentador de la proliferación celular en tejidos humanos envejecidos~~). La
- 10 patente china CN1156601 describe el uso de una de una composición medicinal... preparada a partir de 13 plantas, incluida la *Curcuma longa*, como agente reductor de los triglicéridos y colesterol aumentando las HDL.

- En la literatura científica el número de documentos recuperados es abundante,
- 15 describiéndose diferentes actividades farmacológicas tales como agente... antitumoral, antiinflamatorio, cicatrizante, inhibidor de la proliferación, antifúngico... etc.

- El extracto acuoso de *Curcuma longa*, libre de curcuminoides, ha mostrado...
- 20 también una actividad antioxidante, Srinivas et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **292** nº2 617-623 (1992), describiendo la actividad antioxidante de la turmerina, proteína presente en los rizomas de Curcuma. Yeharayou et al *Ind J. Med. Res.* **64**, 4, 601 (1976), describen la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Curcuma longa* con una actividad similar a la hidrocortisona. Gonda
- 25 et al. *Chem Pharm Bull* **40**, 990 (1992) nos enseña la actividad inmunológica del ukonano A y sus productos de degradación.

- El documento más cercano a nuestra invención Tonnessen et al *J. Pharm. Sci* **76**, nº5 (1987) describe la actividad fototóxica de la curcumina en sistemas
- 30 biológicos sin núcleo (*E. Coli*, *Salmonella typhimuis*); sin embargo este documento nos comenta los posibles efectos mutagénicos producidos sobre DNA. Dhal y colaboradores *Photochemistry and Photobiology* **59** n 3, 290 (1994) describen la actividad fototóxica de la curcumina en células de ratas.

- 35 El extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* contiene curcuminoides pero la actividad fotosensibilizante del extracto es mucho mayor a la curcuminina pura.

- 5 Ningún documento del estado de técnica describe la acción fotosensibilizante de los extractos acuosos *Curcuma longa*, inhibición de secreción de las citocinas inflamatorias después de la irradiación con UVA de extractos acuosos de *Curcuma longa* y/o los efectos beneficiosos a nivel clínico e histológico de una composición farmacéutica cuyo principio activo es el extracto acuoso de
-
- 10 *Curcuma longa* en diferentes tipos de psoriasis por vía oral y tópica.

- El desarrollo de esta nueva actividad farmacológica de los extractos de *Curcuma longa* hace de él un fármaco ideal para el tratamiento de patologías con una hiperproliferación celular como la psoriasis, sin los efectos secundarios que
- 15 poseen los tratamientos utilizados actualmente (psoralenos, corticoides).

- Tampoco el estado de la técnica describe la acción reductora del fibrinógeno y del cociente Apolipoproteína B /Apolipoproteína A-I de los extractos *Curcuma longa*. El desarrollo de esta nueva actividad farmacológica de los extractos de
- 20 *Curcuma longa* hace de él un fármaco ideal para el tratamiento de la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, sin modificar los parámetros de la coagulación.

- Los documentos más cercanos a nuestra invención describen la actividad
- 25 reductora de los peróxidos lipídicos, reductora del colesterol que son factores etiopatogénicos del proceso aterosclerótico, sin embargo no existe una relación directa entre estos factores.

- De esta manera, la vitamina C y la vitamina E drogas que poseen una actividad
- 30 antioxidante y reductora de los peróxidos lipídicos no han causado efecto en la concentración plasmática del fibrinógeno en humanos tras su administración. (Bates et al *J Hypertens*. Jul; **16** (7): 925-32 (1998)). Moghadasian et al *Circulation* Abr 6; **99** (13): 1733-1739 (1999) concluyen que el probucol que posee una conocida capacidad hipolipolipimiente y antioxidante aumenta las
- 35 concentraciones plasmáticas de fibrinógeno, mostrando una actividad proaterogénica. Rifici et al *Thromb Haemost* Sep; **78** (3): 1111-4 (1997)

- 5 demuestran que la lipooxidación producida por vitaminas antioxidantes no altera la actividad fibrinolítica.

El uso de extractos vegetales de plantas con actividad farmacológica es conocido, de la misma forma los principios activos pueden ser aislados y

- 10 purificados a partir de los extractos de las plantas. Sin embargo los principios activos purificados y/o obtenidos sintéticamente podrían tener efectos secundarios o ser tóxicos, por ejemplo atropina, digital, nicotina etc.

- Los extractos vegetales contienen una serie de especies químicas relacionadas
- 15 estructuralmente debido a los procesos metabólicos en las plantas. Estos compuestos relacionados pueden ejercer un efecto sinérgico en la actividad farmacológica. Éstas sustancias químicas se utilizan como marcadores, con el fin de estandarizar los extractos cualitativamente y cuantitativamente. Los extractos alcohólicos de *Curcuma* se caracterizan químicamente por la
- 20 presencia de curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetxosicurcumina), el extracto acuoso de *Curcuma* se caracteriza por la ausencia de curcuminoides, por la presencia de una fracción proteica y por una fracción polisacárida, en los que se han identificado el ukonano A, B y C. La acción farmacológica es debida al conjunto del extracto de *Curcuma longa*,
- 25 extracto acuoso y/o alcohólico.

OBJETIVO DE LA INVENCION

- 30 La presente invención desarrolla una nueva aplicación terapéutica del extracto acuoso y del extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* como agente fotosensibilizante, como agente antiproliferativo, inhibidor de las citocinas IL-6 y IL-8 tras la irradiación con luz ultravioleta y su uso en patologías con un exceso de proliferación celular.

- 5 La presente invención desarrolla una nueva aplicación terapéutica de los extractos de *Curcuma longa* como reductor de los niveles plasmáticos de fibrinógeno reduciéndolos a los valores normales en sujetos sanos y reduciendo el cociente apolipoproteína B /apolipoproteína A.

10 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El extracto alcohólico de *Curcuma longa* se obtiene según la patente española ES 2103689 mediante la extracción de los rizomas de *Curcuma* por maceración con un alcohol (metanol, etanol) a 50° C durante 24 horas y posterior
 15 eliminación del disolvente a presión reducida. El extracto alcohólico de *Curcuma longa* se caracteriza químicamente por la presencia de curcuminoides. Alternativamente se pueden utilizar otros métodos de extracción y/ o purificación conocidos para un experto en la materia tales como extracción con otros
 20 disolventes orgánicos, extracción con disolventes en estado supercrítico, extracción a reflujo, extracción por corriente a vapor y pudiéndose efectuar distintas purificaciones del extracto por cristalización fraccionada, cromatografía, extracción líquido-líquido etc.

De la misma forma el extracto acuoso de *Curcuma* se obtiene por maceración
 25 con agua durante 24 horas a 50 – 70 ° C con posterior eliminación del disolvente a presión reducida. El extracto acuoso de *Curcuma longa* se caracteriza químicamente por la presencia de una fracción proteica con una concentración alrededor del 20-30 %, determinado por el método Pierce, analizando el nitrógeno proteico, y un contenido en polisacáridos (ukonano A, B y C)entre el
 30 3 –8 % y la ausencia de curcuminoides, no siendo objeto de la invención el procedimiento de fabricación de los extractos de *Curcuma longa*.

Alternativamente se pueden efectuar combinaciones con los dos extractos obteniéndose extractos hidroalcohólicos caracterizándose químicamente los
 35 extractos por su concentración en los marcadores (concentración en curcuminoides y concentración en proteínas y en concentración polisacáridos).

- 5 El contenido de los marcadores se puede realizar por los métodos descritos en el estado de la técnica. Los curcuminoides se pueden cuantificar mediante espectrofotometría de visible-ultravioleta a 420 nm, la fracción proteica se puede cuantificar mediante el método Pierce analizando el nitrógeno proteico y/o mediante cromatografía de líquidos, la fracción polisacárica se cuantifica
-
- 10 mediante cromatografía de líquidos.

- El extracto hidroalcohólico *Curcuma longa* ha mostrado una actividad farmacológica superior a la curcumina (mayor actividad proliferativa, mayor actividad fotosensibilizante, mayor inhibición de la secreción de citocinas),
- 15 apoyando estos resultados que los extractos vegetales son fármacos diferentes a los moléculas responsables de la acción farmacológica por que existe una farmacodinamia diferente (absorción, distribución, acción y eliminación) pudiéndose producir efectos sinérgicos o antisinérgicos entre los diferentes especies químicas presentes en el extracto. El extracto hidroalcohólico de
- 20 *Curcuma longa* ha mostrado una actividad antiproliferativa similar a la betametasona – 17- valerato. Este extracto hidroalcohólico mostró una disminución significativa en la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) en el DNA de cultivos de queratinocitos humanos entre concentraciones entre 5 µg/ml y 50 µg/ml de extracto, siendo este efecto similar a la betametasona – 17-
- 25 valerato.

- Tanto el extracto acuoso de *Curcuma* como el extracto de hidroalcohólico de *Curcuma longa* han inhibido la secreción de citocina IL-6 y/o IL-8 en cultivos de queratinocitos humanos con una actividad similar a la betametasona – 17-
- 30 valerato, aumentándose esta inhibición tras irradiar la células como luz ultravioleta A.

- Los extractos hidroalcohólicos y acuosos de *Curcuma* han mostrado una inhibición de la proliferación celular sin alterar actividad mitocondrial, no
- 35 teniendo los extractos efectos sobre la síntesis de proteínas, por lo tanto el extracto posee una actividad citoestática.

5 Por otra parte los extractos hidroalcohólico poseen una actividad fotosensibilizante y por lo tanto pueden ser utilizados en las patologías proliferativas como psoriasis, vitíligo, linfomas, micosis fungoide, etc. como sustituto de los psoralenos.

10 Los extracto de *Curcuma longa* en estudios realizados con sobre células eucariotas (queratinocitos humanos), se ha encontrado en el citoplasma la curcumina activada por consiguiente el núcleo está libre de curcumina y el extracto no interacciones con el DNA nuclear no apareciendo los efectos secundarios y mutagénicos producidos por los psoralenos.

15 El extracto hidroalcohólico (10% de curcuminoides, 18% de fracción proteica, 3% en polisacáridos) de *Curcuma* muestra una mayor actividad fotosensibilizante tras la irradiación con UVA que la curcumina.

20 Así, para una mayor actividad fotosensibilizante (menor porcentaje de incorporación de BrdU) es menor una menor cantidad de droga.

% incorporación	80	60	40	20
Ng extracto	2000	4000	5000	6000
Ng curcumina equiv	200	400	500	600
Ng curcumina	600	800	1000	1200

25 Para producir el mismo grado de fotosensibilización que los extractos de *Curcuma* es necesario emplear dosis de 10 ng/ml de psoraleno produciendo a estas dosis efectos tóxicos y mutagénicos.

30 La administración de una crema cuyo principio activo es el extracto acuoso de *Curcuma longa* al 2%- y un comprimido al día con 100 mg de extracto acuoso con los excipientes farmacéuticamente aceptables se ha mostrado eficaz clínicamente en los diferentes tipos de psoriasis, potenciándose los efectos tras

- 5 la irradiación con luz ultravioleta A, no mostrándose efectos secundarios como sucede con el uso de corticoides.

Se estudiaron 22 pacientes afectados de diferentes tipos de psoriasis: Guttata, Vulgar, Invertida, Palmo-plantar, Postulosa. Durante 15 días estuvieron sin

- 10 ningún tratamiento antipsoriático (retinoides, corticoides, etc.), posteriormente se les aplicó solamente la crema con extracto acuoso de Curcuma y se les administró un comprimido cada 12 días. La crema fue perfectamente tolerada por todos pacientes y ningún paciente tuvo que suspender el tratamiento por presentar reacciones adversas cutáneo o sistémico.

- 15 Todos los pacientes y todos los tipos de psoriasis respondieron a esta terapia. En la psoriasis palmo-plantar que es rebelde a los tratamientos convencionales todos los pacientes respondieron al tratamiento. En la psoriasis vulgar se redujo la placa tras la administración. En la psoriasis pustulosas fisuradas y/o ulceradas cicatrizaron rápidamente. En la psoriasis invertida se vio un efecto antiséptico y
20 secante.

La asociación del extracto acuoso de Curcuma con UVA favoreció la acción del producto, blanqueando las lesiones a los tres días de tratamiento.

- 25 Los extractos de *Curcuma longa* (50 mg de extracto alcohólico y 50 mg de extracto polar de *Curcuma longa*), equivalentes a 10 mg de curcuminoides y 15 mg de proteínas y 2 mg de polisacáridos) junto excipientes farmacéuticamente aceptables administrados durante 30 días, 2 comprimidos al día a 30 individuos sanos (16 hombres-14 mujeres) con edades comprendidas entre 24 y 75 años
30 mostró una reducción significativa en los niveles de fibrinógeno, estando los valores al final de tratamiento entre 240-290 mg/dl. Tras la administración de los extractos de Curcuma los niveles de fibrinógeno plasmático se normalizaron hasta los valores estándar, es decir los extractos de Curcuma no poseen una actividad fibrinolítica, reduciendo solamente los niveles de fibrinógeno en los
35 individuos con altos niveles de fibrinógeno.

- 5 Así valores de 809, 690, 584, 490 mg/dl de fibrinógeno pasaron a valores de 241,240, 290,272 mg/dl tras el tratamiento.

Los parámetros de la coagulación tales como Índice de Quick, tiempo de trombina, APTT, tiempo de protombina, no sufrieron cambios significativos, estando los valores al final del tratamiento dentro de los valores de referencia.

No se observaron efectos secundarios tales como hemorragias, náuseas, vómitos, etc. No mostrando toxicidad alguna los comprimidos.

- 15 A continuación la invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, no siendo limitativos del alcance de la misma.

20

BREVE EXPLICACIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1- Inhibición de la secreción de IL-6 y IL-8 tras la irradiación con luz ultravioleta del extracto acuoso de Curcuma (ZCL3) y betametasona -17-valerato (B-17-V).

- Figura 2- Inhibición de la secreción de IL-6 y IL-8 tras la irradiación con luz ultravioleta del extracto hidroalcohólico de Curcuma (ZCL4) y betametasona -17-valerato (B-17-V).

30

- Figura 3- Incorporación de BrdU del extracto hidroalcohólico de Curcuma (ZCL4) y betametasona -17-valerato (B-17-V).

- Figura 4- Efecto del extracto acuoso de Curcuma (ZCL3) sobre la incorporación de BrdU en el DNA tras la irradiación UV. Capacidad fotosensibilizante.

35

- 5 Figura 5- Efecto del extracto hidroalcohólico de Curcuma (ZCL4) sobre la incorporación de BrdU en el DNA tras la irradiación UV. Capacidad fotosensibilizante.

Figura 6- Efecto de la curcumina sobre la incorporación de BrdU en el DNA tras

- 10 la irradiación UV. Capacidad fotosensibilizante.

Figura 7- Efecto del psoraleno sobre la incorporación de BrdU en el DNA tras la irradiación UV. Capacidad fotosensibilizante.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Variación del fibrinógeno plasmático y parámetros de coagulación tras la ingesta de Curcuma.

20

Sobre un total de 30 individuos sanos (16 hombres y 14 mujeres) con edades comprendidas entre 24 y 75 años con buen estado de salud se estudió el efecto de los extractos de Curcuma sobre el fibrinógeno y los parámetros de coagulación.

25

A tiempo cero se extrajo sangre de la vena cubital y se determinó el fibrinógeno plasmático por el método de Clauss por coagulación. (Clauss A. *Acta haemat.* 1957;17: 237) y los parámetros de coagulación.

30 Durante 15 días se administraron 2 comprimidos diarios y a los 30 días de empezar el tratamiento se volvió a determinar el fibrinógeno plasmático y los parámetros de coagulación.

-Composición por comprimido:

35	Extracto hidroalcohólico de <i>Curcuma</i>	100.0 mg *
	Celulosa microcristalina	490.8 mg
	Almidón de maíz	45,0 mg

5	Aerosil	1.5 mg
	Primojel	22.5 mg
	Encompress	15.0 mg
	Estearato magnésico	10.1 mg

- 10 *Equivalente a no menos de 10 mg de curcuminoides y 15 mg de fracción proteica y 2 mg de polisacáridos.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

SEXO	FIBRINÓGENO T=0	FIBRINÓGENO T=30
V	228	215
M	263	267
V	237	215
M	245	272
M	173	250
V	256	216
V	354	335
M	220	243
V	216	210
V	205	221
V	226	371
V	189	168
M	251	282
M	216	216
M	251	302
V	191	191
V	476	272
M	302	218
M	243	187
V	207	201
V	232	305
V	296	296

V	809	241
M	237	409
V	254	267
M	480	268
M	690	240
V	584	290
M	490	272
M	490	272

5

Valores de referencia fibrinógeno: 150 – 450 mg/dl.

El extracto de Curcuma normaliza los valores patológicos de fibrinógeno a los valores de referencia.

10 Variación de los parámetros de coagulación tras la ingesta de *Curcuma longa*

T. Protombina		I.Quick		APTT		T. Trombina	
T=0	T=30	T=0	T=30	T=0	T=30	T=0	T=30
13.3	13.3	85.9	85.9	29.3	30.6	16.6	17.0
12.3	13.5	95.7	84.2	30.9	28.1	15.9	11.0
13.2	13.4	86.8	85.1	29.3	31.2	17.3	15.9
14.2	14.1	78.7	74.0	37.9	34.4	16.6	16.8
13.8	13.6	81.7	83.4	30.7	26.5	16.6	12.0
13.1	14.2	87.7	78.7	31.2	33.5	16.4	16.2
13.2	12.8	86.8	90.6	30.8	31.3	17.0	16.2
13.3	12.8	85.9	90.6	30.1	31.4	15.9	15.9
13.5	14.1	84.2	79.4	30.4	30.3	16.9	16.3
14.8	13.8	74.5	81.7	30.6	32.3	16.3	16.0
12.9	13.7	86.6	82.5	33.9	30.0	15.9	15.8
14.6	13.9	75.8	80.9	34.7	31.8	17.2	16.3
13.5	12.3	84.2	95.7	36.8	30.2	17.1	16.4
13.7	13.7	82.5	82.5	29.5	29.5	16.7	16.7
13.0	13.5	88.7	84.2	31.2	29.8	17.3	16.7

14.4	14.4	77.2	77.2	33.3	33.3	17.1	17.1
12.0	14.9	99.1	73.8	31.3	29.3	15.9	15.5
14.0	13.9	80.2	80.9	29.9	33.2	16.8	15.2
12.9	14.3	89.6	77.9	30.3	32.3	15.9	16.3
14.3	13.9	77.9	80.9	35.2	32.8	17.3	17.3
13.8	12.2	81.7	96.9	30.6	28.9	16.2	16.7
12.6	12.6	92.6	92.6	33.0	33.0	15.9	15.9
13.7	13.5	82.5	84.2	29.1	29.1	16.1	17.0
13.1	11.6	87.7	100	30.2	30.5	16.2	14.0
13.0	12.4	88.7	94.7	28.7	28.9	16.2	16.2
14.8	13.8	89.6	90.9	32.9	29.9	16.1	15.9
15.2	14.0	83.2	89.8	31.6	30.1	17.2	14.9
13.9	13.9	86.8	100	34.2	32.4	15.4	16.0
14.6	12.8	70.9	88.8	30.8	28.8	15.9	16.3
13.8	14.1	84.8	90.4	33.7	30.0	16.1	14.8

5

Valores de referencia

Tiempo de protrombina: 10 – 20 segundos

Tiempo de trombina: 10 – 20 segundos

Indice Quick: 75 – 100

10 APTT: 28–40 segundos.

Todos valores después del tratamiento estaban dentro de los valores de referencia.

15 Ejemplo 2. Variación del cociente apolipoproteína B/ apolipoproteína A tras la ingesta de comprimidos de Curcuma.

20 Sobre un total de 13 individuos sanos con edades comprendidas entre 24 y 75 años con buen estado de salud se estudió el efecto de los extractos de Curcuma sobre las apolipoproteínas A-I y B.

- 5 A tiempo cero se extrajo sangre de la vena cubital y se determinaron las apoproteínas A-I y B nefelométricamente y posteriormente se calculó su cociente. Tras 15 días de tratamiento, según el ejemplo 1 se reanalizaron las apolipoproteínas A-I y B.

Apo B		Apo A		ApoB/ApoA	
T=0	T=30	T=0	T=30	T=0	T=30
100	120	104	100	1.04	0.83
120	160	141	110	1.17	0.68
157	172	136	126	0.86	0.73
130	141	96	90	0.73	0.63
146	160	65	60	0.44	0.38
155	166	70	53	0.46	0.32
90	138	101	82	1.10	0.59
125	164	99	74	0.79	0.45
110	151	86	76	0.78	0.50
160	179	109	88	0.68	0.49
99	133	102	90	1.03	0.67
104	141	116	103	1.10	0.73

10

Tras la ingesta del extracto de *Curcuma longa* se observa una tendencia significativa a la baja del cociente ApoB/ApoA.

15 Ejemplo 3 Efecto del extracto acuoso de Curcuma en la psoriasis

Composición cuantitativa de la crema:

Extracto acuoso de Curcuma *	2 %
Fase grasa	27 %
Emulgentes	47 %
Humectantes	20 %
Conservantes	1%

20

5	Reguladores pH	1%
	Agua	cps

*Contenido en proteínas no menor al 15%, contenido en polisacáridos no menor al 4%.

- 10 Se estudiaron 22 pacientes diagnosticados de psoriasis distribuidos por edades y sexo.

Sexo	Edad	Tipo psoriasis
M	12	Guttata
M	22	Vulgar
M	37	Palmo-plantar
V	24	Vulgar
V	48	Vulgar
M	51	Invertida
M	27	Palmo-plantar
V	19	Vulgar
V	57	Palmo-plantar
V	61	Invertida
M	46	Palmo-plantar
V	6	Pustolosa Loc
V	16	Vulgar
M	32	Vulgar
M	39	Pustulosa loc
M	41	Vulgar
V	31	Palmo-plantar
M	13	Guttata
M	3	Vulgar
M	51	Vulgar
M	60	Invertida
M	19	Palmo plantar

2

5

5

5

5

5

5 Criterios de inclusión:

- Pacientes diagnosticados de psoriasis clínicamente e histológicamente.
- No presentaban otra patología concomitante.
- No recibieron tratamiento antipsoriático.

10 Protocolo:

A los 22 pacientes se les mantuvo durante 15 días sin ningún tipo de tratamiento, emolientes, corticoides, retinoides, ácidos grasos.

Se les indicó a los pacientes que se aplicaran la formulación 3 veces al día con un ligero masaje y 1 comprimido cada 12 horas.

15

Resultados:

Todos los pacientes mostraron una buena tolerancia. La crema no presentó ningún tipo de reacción irritativa o de contacto.

Los casos que mostraban psoriasis guttata evolucionaron de la misma forma.

20 Las lesiones que presentaban eran poco escamosas pero muy eritematosas. A los 7 días de tratamiento no había ya escamas y el eritema presentado era mínimo. A los 14 días de tratamiento las lesiones no se percibían. No se presentaron lesiones pigmentarias residuales.

25 De las 6 psoriasis palmo-plantares, 4 de ellas presentaban una afectación más evidente de las palmas, con lesiones escamosas y con una fisuración importante. A los 7 días de tratamiento la fisuración dolorosa y penosa para los pacientes había desaparecido, sólo se percibió una lesión eritematosa de los bordes mal definidos sin prácticamente nada de escamas. A los 14 días las lesiones se limitaban a una mácula ligeramente eritematosas con una piel de características normales. Las lesiones plantares presentaban hiperqueratosis importante con fisuración, fueron más rebeldes y se obtuvieron resultados a los 30 14 días de tratamiento, observándose una cicatrización de las fisuras.

35 Los dos pacientes que presentaban psoriasis pustulosa cicatrizaron las lesiones a la semana de tratamiento y la desaparición de la descamación se produjo a los 14 días de tratamiento.

- 5 En los pacientes afectados de psoriasis invertida las lesiones presentaban una ligera descamación e intensamente eritematosas con la superficie erosionada. Se practicaron cultivos y las placas estaban contaminadas por *Candidas*. A los 7 días de tratamiento la descamación había desaparecido y el eritema disminuido. A los 14 días de tratamiento sólo se observó una mácula
-
- 10 ligeramente eritematosa.

- La psoriasis vulgar fue la mas estudiada debido a tener un número mayor de pacientes. Las lesiones localizadas en tronco presentaban una infiltración importante y descamación periférica. En las articulaciones predominaba la
- 15 hiperqueratosis. A los 7 días de tratamiento disminuyó drásticamente la infiltración y el eritema. A los 14 días de tratamiento la evolución fue positiva tanto en tronco como en articulaciones de modo que solo se percibían lesiones mínimamente eritematosas en el tronco y algo descamativas en codos y rodillas.

- 20 Los pacientes tratados con PUVA con psoriasis palmo plantar a las 72 horas de tratamiento desaparecieron las fisuras y las descamaciones. Los pacientes tratados con PUVA con psoriasis vulgar después de 2 sesiones las lesiones se mostraron sin infiltración y descamación.

- 25 Ejemplo 4. Efectos del extracto de *Curcuma longa* sobre la secreción de las interleucinas IL-6 y IL-8 en cultivos de queratinocitos humanos.

Cultivo de la línea HaCat:

- La línea HaCat es una línea inmortalizada de queratinocitos humanos normales.
- 30 Estas células cultivan en un medio de cultivo compuesto por líquido de Hanks al cual se le adiciona un 5% de suero bovino fetal y un 2% de penicilina-estreptomicina a 37° C en atmósfera de CO₂.

Determinación de las interleucinas:

- 35 Después de 48 horas de incubación con o sin radiación, se toma el sobrenadante de los cultivos para medir la IL-6 IL-8 utilizando un test -kit

- 5 ELISA. El mínimo de detección de para cada ensayo es de 3.13 pg/ml para la IL-6 y 31.0 pg/ml para la IL-8.

Irradiación de las células.

Las células fueron irradiadas mediante una lampara de emisión de UVA/UVB cuyo rango es de UVA 340-390 nm; UVB 290-310, no emitiendo UVC. Las dosis

- 10 de irradiación fueron de 150 mJ/cm^2 . Para evitar la formación de productos tóxicos procedentes del medio de cultivo se cambió por PBS libre iones calcio y magnesio antes de la irradiación.

Resultados:

- 15 El extracto hidroalcohólico y acuoso de Curcuma a dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ inhibieron la secreción de las interleucina IL-6 y IL-8 tras la irradiación con luz UVB de forma similar que la betametasona -17-valerato. Figura 1, 2.:

Ejemplo 5. Efecto de los extractos de *Curcuma longa* sobre la incorporación de...

- 20 BrdU en el DNA de queratinocitos humanos.

Cultivo de la línea HaCat:

La línea HaCat es una línea inmortalizada de queratinocitos humanos normales....

Estas células cultivan en un medio de cultivo compuesto por líquido de Hanks al: :
cual se le adiciona un 5% de suero bovino fetal y un 2% de penicilina-: :

- 25 estreptomycin a 37° C en atmósfera de CO₂.

Incorporación de BrdU :

Para determinar la tasa de replicación, las células fueron cultivadas en: :
microplacas a una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Después de 24 horas: :
de tratamiento el medio fue renovado y los cultivos fueron incubados durante 24: :

- 30 horas a 37°C con diferentes concentraciones de los extractos y betametasona -
17 - valerato con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Se realizaron controles con el
disolvente (etanol 0.1%) en paralelo. La incorporación de BrdU se determinó
con test de ELISA.

Resultados:

- 35 La incubación de las células con 50 $\mu\text{g/ml}$ de extracto hidroalcohólico conduce a
una disminución significativa en la incorporación con BrdU. El extracto

- 5 hidroalcohólico, combinación del extracto alcohólico y acuoso de *Curcuma longa*, demostró una actividad antiproliferativa similar a la betametasona – 17-valerato. Figura 3

Ejemplo 6 . Efecto de los extractos de *Curcuma longa* sobre la incorporación de

- 10 BrdU en el DNA de queratinocitos humanos tras la irradiación con luz ultravioleta.

Cultivo de la línea HaCat:

La línea HaCat es una línea inmortalizada de queratinocitos humanos normales.

- 15 Estas células cultivan en un medio de cultivo compuesto por líquido de Hanks al cual se le adiciona un 5% de suero bovino fetal y un 2% de penicilina-estreptomicina a 37° C en atmósfera de CO₂.

Incorporación de BrdU:

- 20 Para determinar la tasa de replicación, las células fueron cultivadas en microplacas a una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Después de 24 horas de tratamiento el medio fue renovado y las cultivos fueron incubados durante 24 horas a 37°C con diferentes concentraciones de los extractos, de la curcumina y psoraleno a diferentes concentraciones. Se realizaron controles con el disolvente (etanol 0.1%) en paralelo. La incorporación de BrdU se determinó con test de ELISA.

Las células se irradiaron con luz UVA con una intensidad 1J/cm² y posteriormente se analizó la incorporación de BrdU.

Resultados :

- 30 El extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* con un 10% de curcuminoides, un 18 % en proteínas y un 3% en fracción polisacárida mostró una actividad fotosensibilizante mayor que la curcumina tras la irradiación con luz UVA, es decir menor cantidad de producto un porcentaje de incorporación.

- 35 El extracto acuoso de *Curcuma longa* posee una actividad fotosensibilizante.

- 5 Para producir el mismo grado de fotosensibilización que los extractos de Curcuma es necesario emplear dosis de psoraleno tóxicas (10 ng/ml). Figuras 4, 5, 6, 7.

10

15

20

25

30

35

4

5

6

7

5 REVINDICACIONES

1.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*, compuesto por una extracto alcohólico y un extracto acuoso, para la fabricación de una composición farmacéutica como agente fotosensibilizante.

10

2.- Utilización de un extracto acuoso de *Curcuma longa* para la fabricación de una composición farmacéutica como agente fotosensibilizante.

3.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*, compuesto por un extracto alcohólico y un extracto acuoso para la fabricación de una composición farmacéutica como agente antiproliferativo.

15

4 Utilización de un extracto acuoso de *Curcuma longa* para la fabricación de una composición farmacéutica para la fabricación de una composición farmacéutica... para inhibir la secreción de las citocinas IL-6 y IL- 8 tras la irradiación con luz ultravioleta.

20

5.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*, compuesto por un extracto alcohólico y un extracto acuoso para la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir la secreción de las citocinas IL-6 y IL- 8 tras la irradiación con luz ultravioleta.

25

6.- Utilización de un extracto acuoso de *Curcuma longa* para la fabricación de una composición farmacéutica para tratamiento de la psoriasis.

30

7.- Utilización de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*, compuesto por un extracto alcohólico y un extracto acuoso para la fabricación de una composición farmacéutica como reductor del fibrinógeno.

- 5 8.- Utilización de un extracto de *Curcuma longa*, compuesto por un extracto acuoso y un extracto alcohólico para la fabricación de una composición farmacéutica reductora del cociente Apolipoproteína B / Apolipoproteína A-I.
-

5

5

5

5

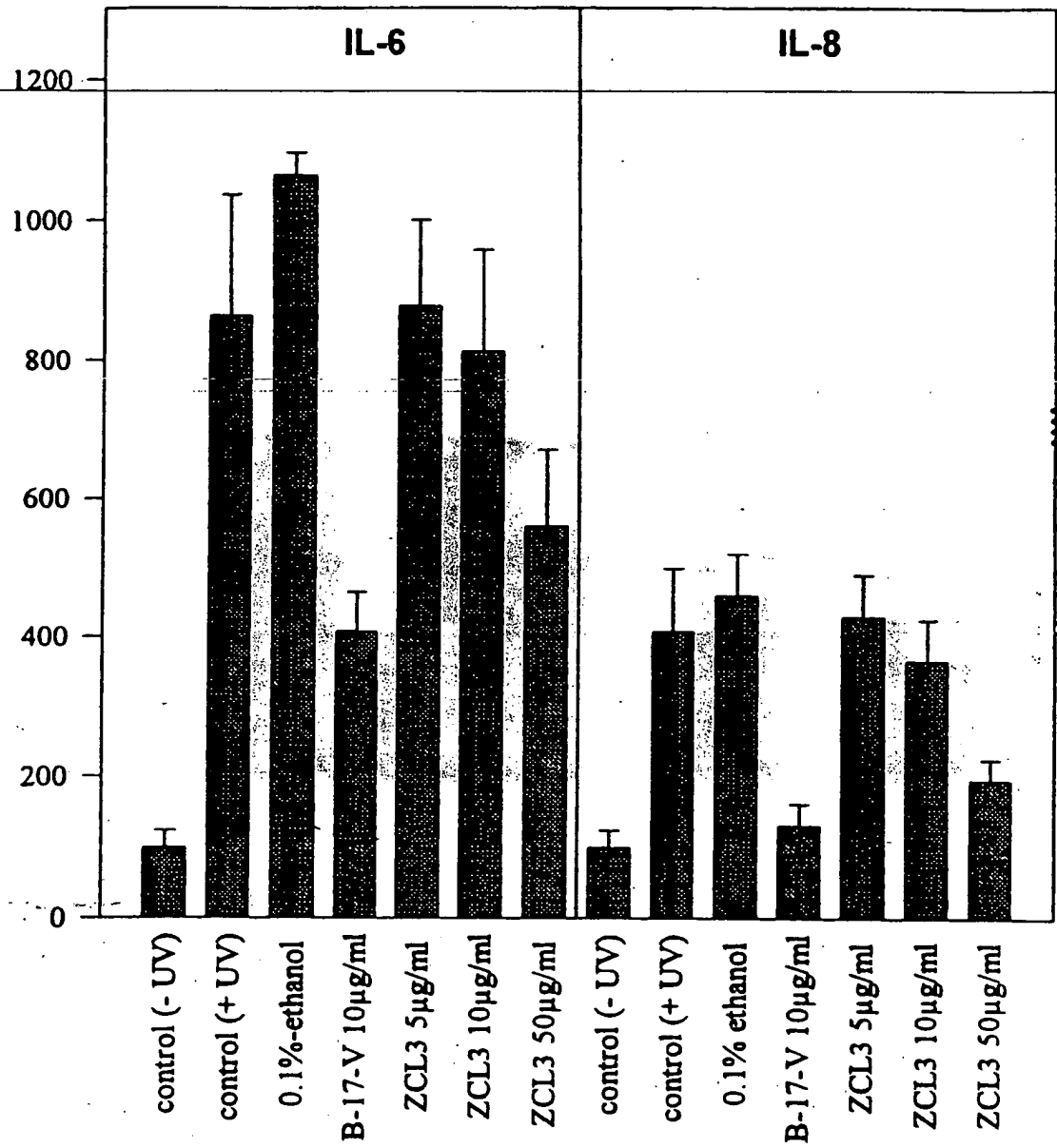


FIG. 1

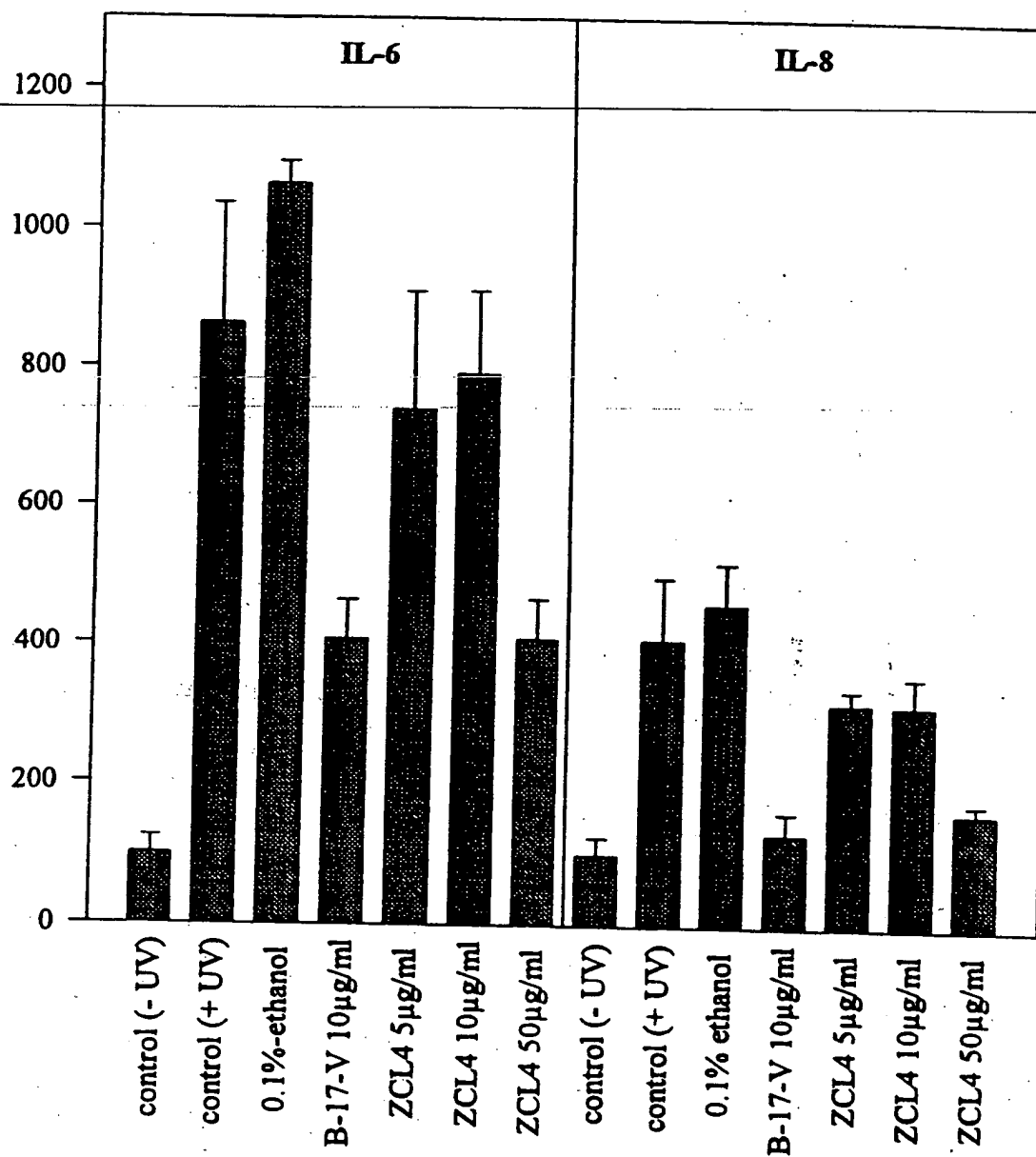


FIG. 2

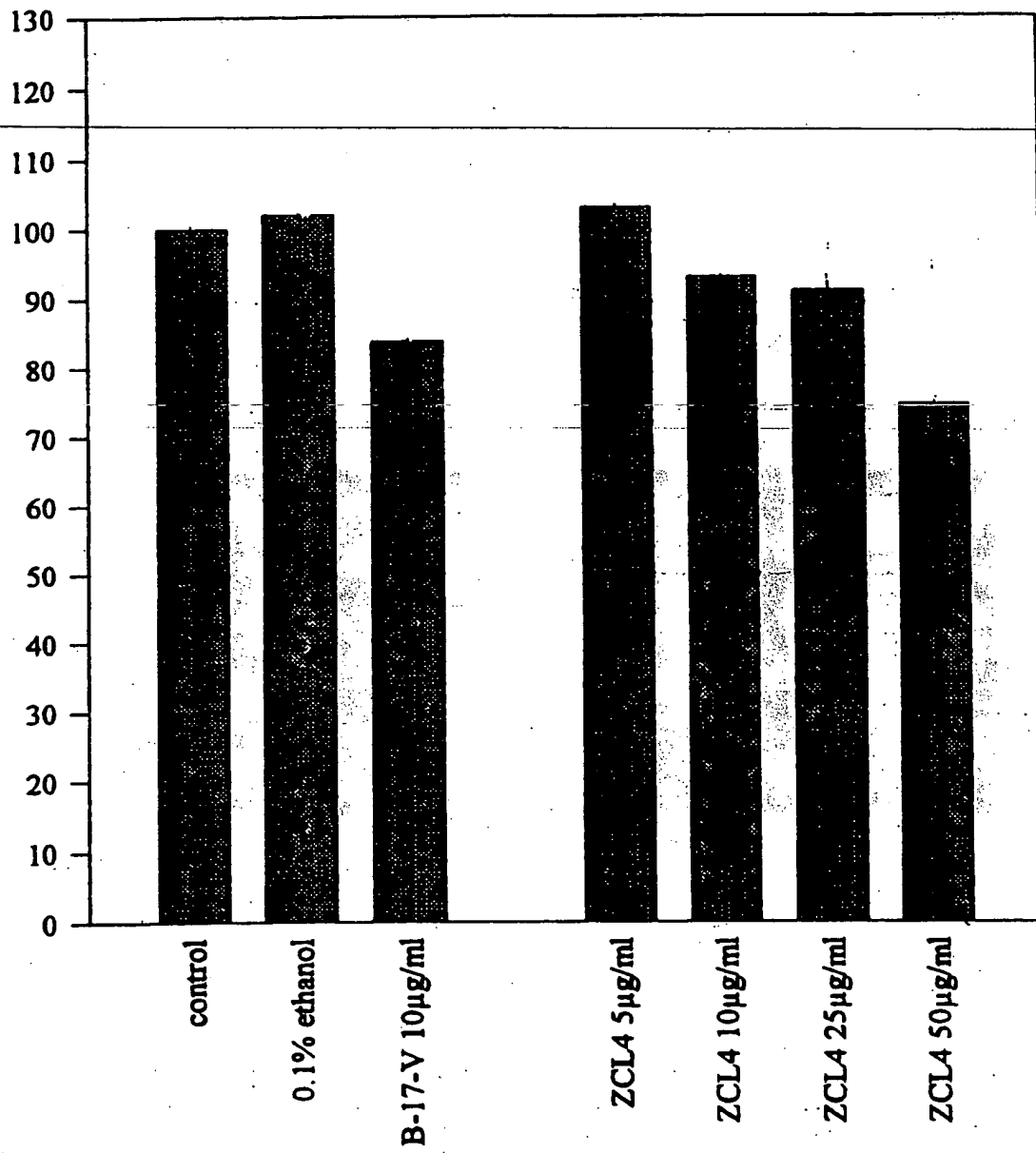


FIG. 3

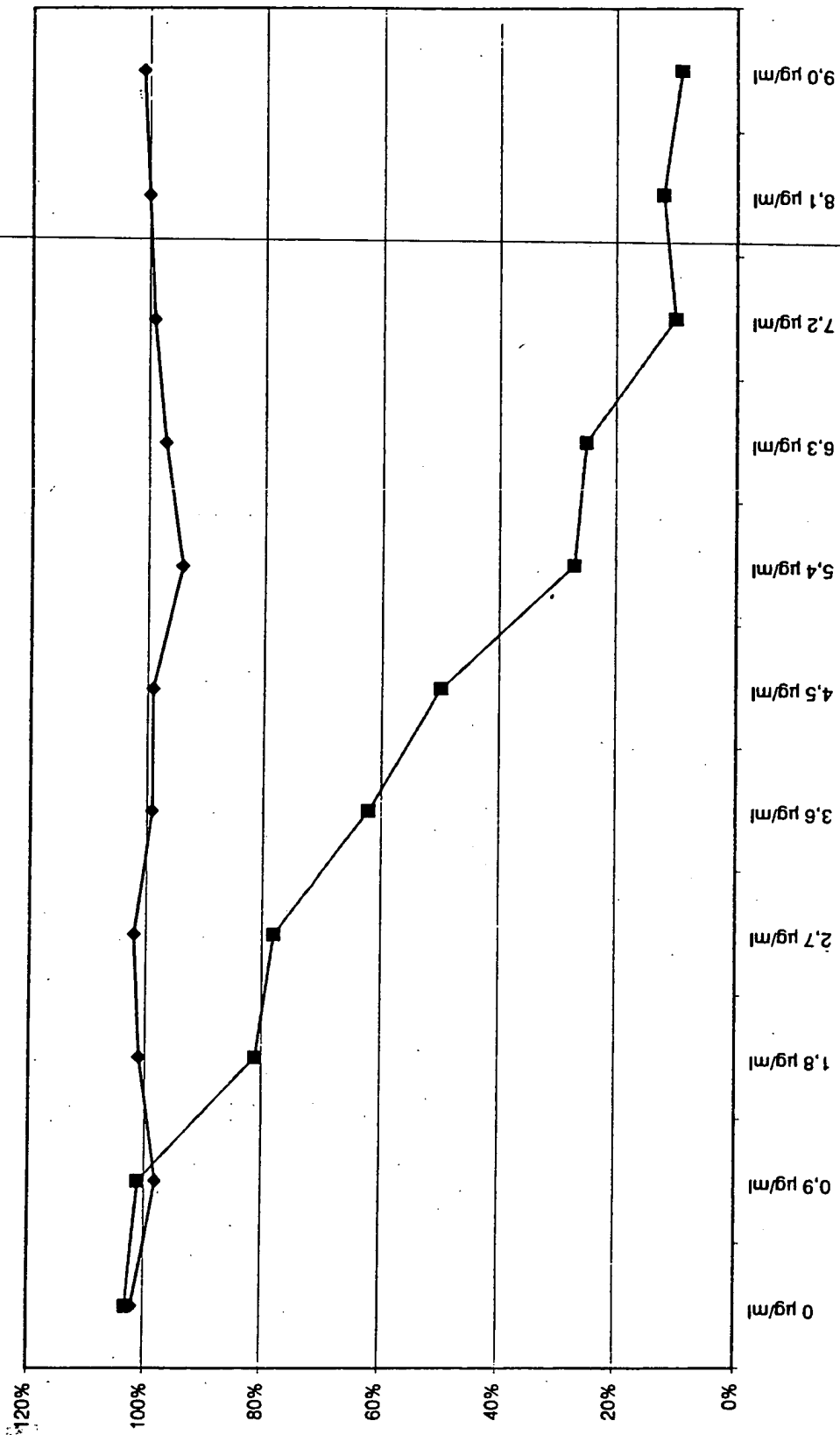


FIG. 4

FIG. 5

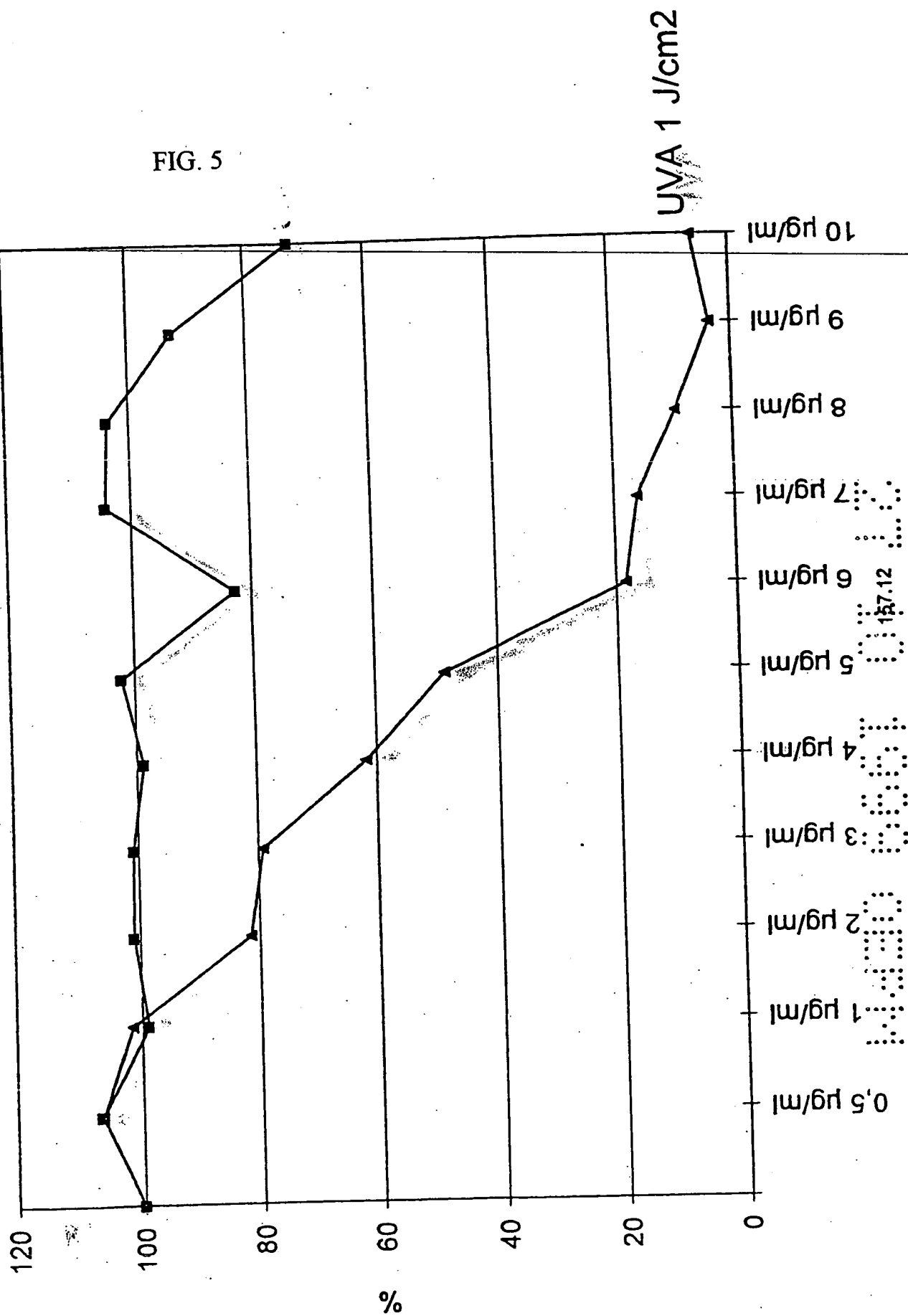


FIG. 6

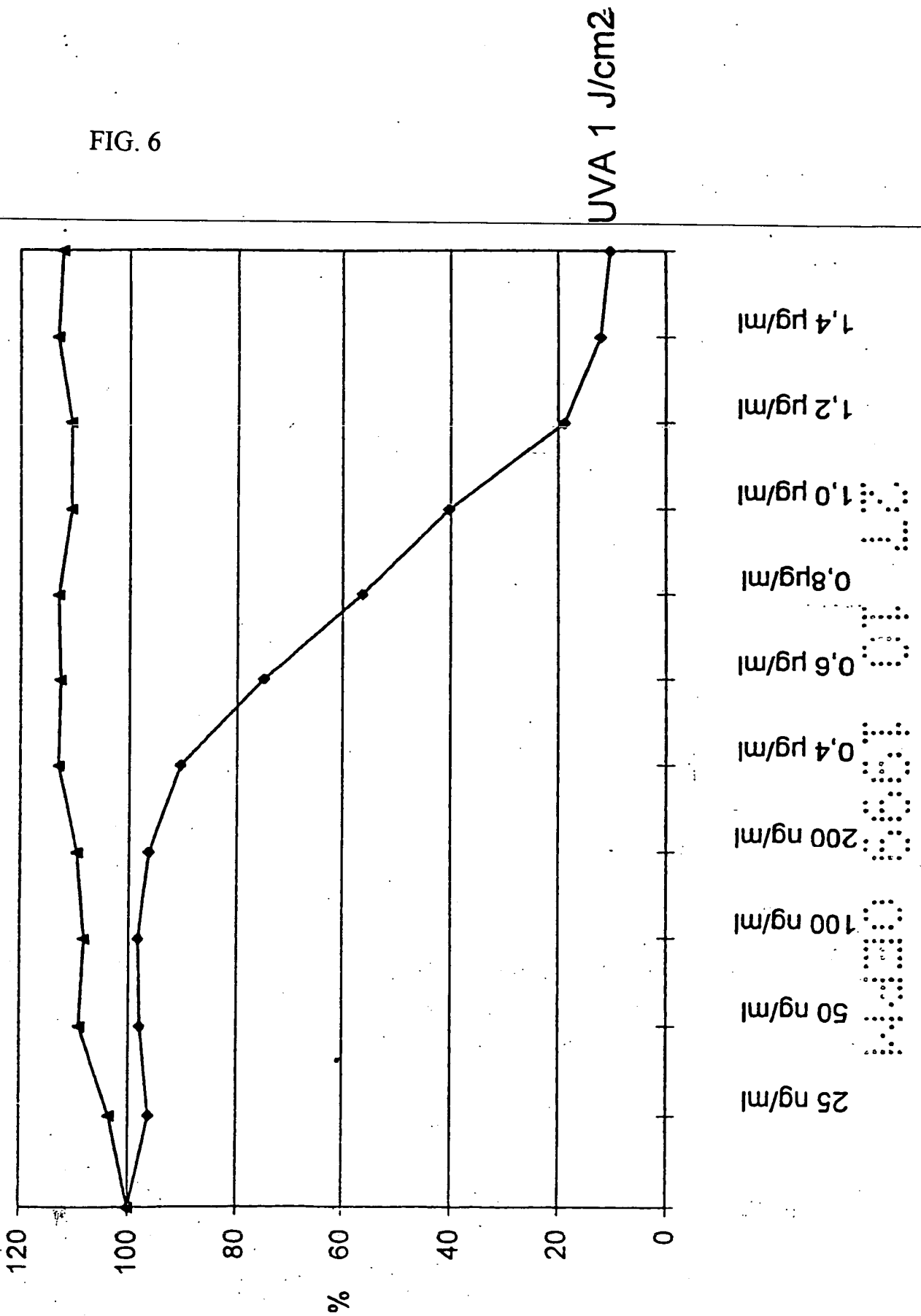


FIG. 7

